

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-144170

(43)Date of publication of application : 26.05.2000

(51)Int.Cl.

C11C 3/00
A23K 1/16
A23L 1/30
A61K 31/00
A61K 31/23
C07C 69/587
C11B 7/00

(21)Application number : 11-245357

(71)Applicant : JANIFU TEK KU:KK

(22)Date of filing : 31.08.1999

(72)Inventor : NATATSU YOSHITAKE
KOGA KENJI
MIZUNO MASAYUKI

(30)Priority

Priority number : 10262295

Priority date : 01.09.1998

Priority country : JP

(54) SUBSTANCE HAVING ANTI-OBESITY FUNCTION AND ACTION TO REDUCE FAT ACCUMULATED IN INTERNAL ORGANS AND ITS USE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a substance that has an anti-obesity function and an action to reduce fat accumulated in internal organs and its use.

SOLUTION: This invention relates to a substance containing conjugatedly isomerized high-degree unsaturated fatty acids and/or their derivatives, and provides a substance containing conjugatedly isomerized high-degree unsaturated fatty acids and/or their derivatives that have an action to specifically accelerate the uncoupling respiration of mitochondria (MC) in the cells in the major tissues of mammals including human and fowls producing untremor heat, for example, skeletal muscles, white adipose tissues (WAT), brown adipose tissues (BAT), or the like and the proton leak on the MC intima; and provides a depot fat-reducing agent that contains the above-described substance as an active ingredient having the anti-obesity action (particularly the inhibition of the fat deposition on internal organs, particularly on the mesentery), provides food products that contain the above-stated substance as an active ingredient and have the anti-obesity action to inhibit the deposition of fat on the internal organs, particularly on the mesentery and the action to reduce the depot fat on the internal organs, particularly on the mesentery, and provides feeds for domestic animals that contain the above-stated substance as an active ingredient and have the anti-obesity action to inhibit the deposition of fat on the internal organs, particularly on the mesentery and the action to reduce the depot fat on the internal organs, particularly on the mesentery.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-144170

(P2000-144170A)

(43) 公開日 平成12年5月26日 (2000. 5. 26)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 1 C 3/00		C 1 1 C 3/00	
A 2 3 K 1/16	3 0 1	A 2 3 K 1/16	3 0 1 H
A 2 3 L 1/30		A 2 3 L 1/30	Z
A 6 1 K 31/00	6 0 3	A 6 1 K 31/00	6 0 3 K
			6 0 3 L
審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 14 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願平11-245357	(71) 出願人	596111601 株式会社ジャニフ・テック 東京都千代田区神田神保町2丁目46番地
(22) 出願日	平成11年8月31日 (1999. 8. 31)	(72) 発明者	名達 義剛 東京都千代田区神田神保町2丁目46番地 吉野ビル1階 株式会社ジャニフ・テック 内
(31) 優先権主張番号	特願平10-262295	(72) 発明者	古賀 憲治 東京都千代田区神田神保町2丁目46番地 吉野ビル1階 株式会社ジャニフ・テック 内
(32) 優先日	平成10年9月1日 (1998. 9. 1)	(74) 代理人	100102004 弁理士 須藤 政彦
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗肥満及び内臓蓄積脂肪低減化機能を有する物質、及びその用途

(57) 【要約】

【課題】 抗肥満及び内臓蓄積脂肪低減化機能を有する物質、及びその用途を提供する。

【解決手段】 共役異性化された高度不飽和脂肪酸類及び／又はその誘導体を含む物質であって、ヒトを含む哺乳動物及び鳥類の非ふるえ熱産生 (nonshivering thermogenesis ; nST) の主要組織、骨格筋、白色脂肪組織

(WAT)、褐色脂肪組織 (BAT) 等の細胞中のミトコンドリア (MC) の脱共役呼吸乃至MC内膜でのプロトンリーク (proton leak) を特異的に亢進する作用を有する共役異性化高度不飽和脂肪酸類及び／又はその誘導体を含む物質、上記物質を有効成分として含む抗肥満 (内臓脂肪 (特に腸管膜脂肪) 蓄積抑制) ・内臓 (特に腸管膜) 蓄積脂肪低減化剤、上記物質を有効成分として含む抗肥満 (内臓脂肪 (特に腸管膜脂肪) 蓄積抑制) ・内臓 (特に腸管膜) 蓄積脂肪低減化機能を付してなる食品、上記物質を有効成分として含む抗肥満 (内臓脂肪 (特に腸管膜脂肪) 蓄積抑制) ・内臓 (特に腸管膜) 蓄積脂肪低減化機能を付してなる飼料。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 共役異性化された高度不飽和脂肪酸類及び／又はその誘導体を含む物質であって、ヒトを含む哺乳動物及び鳥類の非ふるえ熱産生（nonshivering thermogenesis；nST）の主要組織、骨格筋、白色脂肪組織（WAT）、褐色脂肪組織（BAT）等の細胞中のミトコンドリア（MC）の脱共役呼吸乃至MC内膜でのプロトンリーク（proton leak）を特異的に亢進する作用を有する共役異性化高度不飽和脂肪酸類及び／又はその誘導体を含む物質。

【請求項2】 上記作用を有する成分が、共役異性化された高度不飽和脂肪酸（HUF A）類である請求項1記載の物質。

【請求項3】 上記作用を有する成分が、HUF A誘導体の酸化生成物のフランHUF A誘導体である請求項1記載の物質。

【請求項4】 主要なnST組織の骨格筋、白色脂肪組織、褐色脂肪組織等の、ミトコンドリア含有細胞に特異的に作用して該細胞中の脱共役蛋白質同族体（UCP homologue）の発現量を顕著に増大させる作用を有する請求項1、2又は3記載の物質。

【請求項5】 請求項1、2又は3記載の、nSTの主要組織である骨格筋、WAT及びBAT等の細胞中のミトコンドリア（MC）の脱共役呼吸乃至プロトンリークを特異的に亢進する作用を有する物質を有効成分として含む抗肥満（内臓脂肪（特に、腸管膜脂肪）蓄積抑制）・内臓（特に、腸管膜）蓄積脂肪低減化剤。

【請求項6】 請求項1、2又は3記載の、nSTの主要組織である骨格筋、WAT及びBAT等の細胞中のミトコンドリア（MC）の脱共役呼吸乃至プロトンリークを特異的に亢進する作用を有する物質を有効成分として含む抗肥満（内臓脂肪（特に、腸管膜脂肪）蓄積抑制）・内臓（特に、腸管膜）蓄積脂肪低減化機能を付してなる食品。

【請求項7】 請求項1、2又は3記載の、nSTの主要組織である骨格筋、WAT及びBAT等の細胞中のミトコンドリア（MC）の脱共役呼吸乃至プロトンリークを特異的に亢進する作用を有する物質を有効成分として含む抗肥満（内臓脂肪（特に、腸管膜脂肪）蓄積抑制）・内臓（特に、腸管膜）蓄積脂肪低減化機能を付してなる飼料。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、脂肪酸及びビルビン酸を基質とするエネルギー代謝（呼吸）細胞内小器官のミトコンドリア（以下、MC）機能の内、脱共役蛋白質（UCP）によって惹起される脱共役呼吸乃至MC内膜のプロトンリーク（以下、プロトンリークと総称）を特異的に亢進させる作用を有する新規物質、更に詳しくは、本発明は、共役異性化された高度不飽和脂肪酸類及

び／又はその誘導体を含む物質であって、ヒトを含む哺乳動物等のMCのプロトンリークを特異的に亢進する作用を有する新規な物質、及び該物質を有効成分として含む抗肥満（内臓脂肪（特に腸管膜脂肪）（以下、内臓脂肪と略称）蓄積抑制）・内臓（特に腸管膜）（以下、内臓と略称）蓄積脂肪低減化剤、該物質を有効成分として含む抗肥満（内臓脂肪蓄積抑制）・内臓蓄積脂肪低減化機能を付してなる食品、該物質を有効成分として含む抗肥満（内臓脂肪蓄積抑制）・内臓蓄積脂肪低減化機能を付してなる飼料などの用途に関するものである。

【0002】

【従来の技術】生体のエネルギー代謝調節系は、摂食調節系とエネルギー消費調節系から成っている。本発明は、エネルギー調節系の合目的な制御によって生活習慣病等の発症の多重危険因子とされている内臓脂肪の蓄積抑制及びその低減化を具現化する事を目的としている。エネルギー消費調節系は、生命維持の為の基礎代謝に使用されるエネルギー消費とそれ以外のエネルギー消費に分けられる。後者の範疇で主要なものが、非ふるえ熱産生（nonshivering thermogenesis；以下、nST）で、その機能的な意義は生下時、寒冷暴露時、冬眠から覚める時、などの体温維持や、また過剰摂取エネルギーの消費による肥満、糖脂質代謝障害の防御、などが挙げられる。nSTの惹起機序には、ミトコンドリア（MC）の脱共役呼吸乃至MC内膜でのプロトンリーク、即ち、細胞の呼吸鎖の電子伝達系とATP合成、の関与が重要であり、その詳細は以下の通りである。細胞の機能維持にはATPが必須であり、細胞は脂肪酸と、細胞質の解糖系で生成したビルビン酸を細胞内のMCに輸送し、そこで酸化しアセチルCoAを産生させる。このアセチルCoAはクエン酸回路で酸化され、その酸化過程で炭酸ガスとNADHが生成し、更にNADHから高エネルギー電子が生成する。高エネルギー電子がMC内膜の呼吸鎖（電子伝達系）で分子状酸素と結合して、エネルギーを放出する。該エネルギーがプロトン、マトリックスからMC内膜を介して膜間部分へくみ出す。この結果、内膜の両側にプロトンの電気化学的勾配が形成される。次いで、膜間部分のプロトンがこの勾配に従ってマトリックスに戻る際に、膜に結合したATP合成酵素を作動させて、ADP+PiからATPを生成する。

【0003】生体はATPとADPの比を一定に保つ為に、生体の状態に合わせて呼吸鎖の電子伝達系の速度を調節する。ATPの消費が増えると電子伝達の速度も早くなり、それに伴い、基質の供給が必要となる。激しい運動時には休息時の5～10倍の速度で脂肪や糖が酸化される。脂溶性の弱酸の2,4-dinitrophenol（2,4-DNP）はプロトンイオノフォアとして作用して、MC内膜でATP合成酵素以外にプロトンが内膜を通過して流れる経路を作るため、内膜の呼吸鎖で生じたプロトンの電気化学的勾配を消失させ、ATPが合成されなくなる。即

ち、2,4-DNP は呼吸鎖の電子伝達系と、ATP合成を脱共役するので、脱共役剤として働くことになる。ATPが合成されなくなるため、呼吸鎖の電子伝達速度は、基質の供給の許す最大の速度で進行する（細田ら、Mebio, 14 (11), 30-31 (1997)）。

【0004】褐色脂肪組織（BAT）には、その褐色脂肪細胞（BA）のMC内の呼吸鎖電子伝達系とATP合成を脱共役させる特異的蛋白質、脱共役蛋白質-1（UCP-1）、約300アミノ酸から成る分子量32kDの蛋白質が存在する。UCP-1は、約100個のアミノ酸から成るドメインの3回繰り返し構造から成り、また、各ドメインに2箇所ずつ、合計6箇所の膜貫通部位がある。これらの膜貫通部位がチャンネルを形成している。UCP-1はプロトンを輸送するキャリアであり、そのプロトンチャンネルによって電気化学的な勾配に従って自由にプロトンを透過させて、熱を放出する機能を発現させている。これがnSTとなる。脱共役によりATPの合成が低下し、ATPとADPの比を一定に維持するためにMC内の呼吸が活発になり、その結果として大量の脂肪と糖が酸化されて熱が発生する。UCP-1の機能の調節は、その発現量と活性の両面から行われている。即ち、交感神経終末より分泌されたノルアドレナリンが、細胞膜上のβアドレナリン受容体（β-AR）を介してアデニル酸シクラーゼを活性化し、細胞内cAMP濃度を上昇させる。cAMPはプロテインキナーゼA（PKA）の活性化、ホルモン感性リパーゼ（HSL）の活性化を経て中性脂肪を分解し脂肪酸（FFA）を生成する。このFFAは、UCP-1に結合して閉じていたプロトンチャンネルを開放させるとともに、熱産生基質として作用する。一方、UCP-1の発現量は、主に核内の遺伝子の転写レベルで調節されており、cAMP濃度上昇によりUCP-1遺伝子発現は増加する（斎藤ら、最新医学 52, 1095-1096 (1997)）。

【0005】UCP-1の生理的意義としては、生下時、寒冷暴露時などにおける体温維持が重要であるが、そのほかにトランスジェニックマウスを使った研究より、肥満の防御に関与することが明らかになっている。肥満の発症、進展、維持にUCP-1が関与していることは、様々な肥満モデルでUCP-1の発現が低下していることから示唆されていた。更に、BAT減少トランスジェニックマウスで過食無しに肥満が発症することが確認されている（Lowell B B, et al., Nature 366, 740-742 (1993)）。一方、UCP-1を大量発現させると体脂肪が減少することは、UCP遺伝子を脂肪細胞特異的な遺伝子αP2のプロモーターに組み込み、UCP-1を強制発現させたマウスで確かめられた（Kopecky J, et al., J Clin Invest 96, 2914-2923 (1995)）。しかしながら、成人のヒトではBATは極めて少量しか存在せず、BAT特異的なUCP-1の生理的な意義は考えにくいという見方がある。他方においては、このBAT

の生理的意義は、実験動物のみならずヒト成人に対しても当てはまることを、以下の諸点から支持されるとする考え方もある（河田照雄、私信）。

(1) UCP量の測定が可能になった結果、ヒトでもBATが、測定された新生児（1日）から老人（86歳）までの全てに、腎周囲や腹部に存在する。

(2) 量的には15歳までの子供に多いが、成人でも約50gは存在し、この活性低下は一年間に25kgの体重増加をもたらす可能性がある。

10 (3) イヌ成犬でもBATはヒト成人と同様に白色細胞化されていてBATは検出しにくい、β-3アドレナリン受容体作動薬の慢性投与を行うと、未成熟あるいは脱分化した褐色脂肪細胞が活性化されて、分化したBAとしてUCPやその遺伝子mRNAを発現するようになる。

【0006】細胞内のエネルギー消費の約20～40%は、MC内膜のプロトンリークで生じると考えられている。また、BATが少量しかないヒト成人やその外の動物では、nSTの大部分は骨格筋や白色脂肪組織（WAT）で生じると考えられていた。以上のことから、BAT以外の組織におけるUCPの存在が推定されていた。

20 1997年、二つのグループから相次いでUCP-2のcDNAクローニングが報告された（Fleury C, et al., Nature Genet 15, 269-272 (1997)；Gimeno R, et al., Diabetes 46, 900-906 (1997)）。ヒトUCP-2はヒトUCP-1と59%のホモロジーを示し、UCP-1と同様に6箇所の膜貫通部位を有するチャンネルを形成し、且つプリンヌクレオチド結合部位を有していた。UCP-2は、UCP-1とは異なり、全身組織に30 に広汎に発現しており、特に、肺、脾臓で高濃度で、その外に心臓、肝臓、脳、腎臓、精巣、WAT、BAT、骨格筋で発現が検出されている。また、高脂肪食負荷マウスで副精巣周囲脂肪組織のUCP-2遺伝子発現の亢進が認められている。

40 【0007】骨格筋は主要なnSTの組織であるにも拘わらず、UCP-2の骨格筋における遺伝子発現の濃度は、WATで比較的高濃度であるのに対し、低く、骨格筋におけるUCP-2以外のUCPの存在が推定された。骨格筋における新規UCPは、先ずラットで単離・同定され、308アミノ酸より成り、ラットUCP-1、UCP-2と57%、72%のホモロジーを示した。また、ラット組織における遺伝子発現は、骨格筋で特に高濃度で、BATで中等度に、WATと心臓で低濃度に検出された（Matsuda J, et al., submitted）。次いで、2つのグループから、ヒトで骨格筋に高濃度発現しているUCP-3のcDNAクローニングが報告された（Boss O, et al., FEBS Lett 408, 39-42 (1997)；Vidal-Puig A, et al., Biochem Biophys Res Commun 235, 79-82 (1997)）。先のラット新規UCPとは50 87%のホモロジーを示した（細田ら、Mebio 14, (1

1), 33-34, (1997))。

【0008】nSTの主要組織である骨格筋とWATに新たに、従来のものとは異なるUCPの遺伝子発現が確認されたことによって、各々の脱共役蛋白質の単離・同定とその機能の評価、並びにその発現亢進方法の検索が促進され、ヒトの成人の抗肥満に画期的なブレークスルーが創造されるものと期待される。生体内の余剰エネルギーは、先ず優先的に内臓脂肪（特に腸管膜脂肪）として蓄積され、且つこの内臓脂肪は他の部位の脂肪（特に皮下脂肪）に比べ、脂肪動員を受け易く速やかに分解され消費される。この内臓脂肪（肥満）は生活習慣病（成人病）発症の多重危険因子と見なされているが、その理由は、WATの白色脂肪細胞（WA）からの分泌脂肪酸が門脈を経由して直接肝臓に流入してインスリン抵抗性と脂肪合成を亢進し、その結果耐糖能異常、高血圧及び高脂血症を惹起して、最終的にはこれらが合併して動脈硬化を発症するに至る、ことに由来する。以上が、この内臓脂肪の蓄積抑制と蓄積内臓脂肪の低減化が、ヒト成人の生活習慣病発症予防及びその治療に多大の貢献を果たすものと期待される所以である。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】ヒト成人の生活習慣病（成人病）発症の多重危険因子とされる内臓脂肪（特に腸管膜脂肪）の蓄積抑制及び蓄積内臓脂肪の低減化の具現化に、生体エネルギー消費調節系の内のnST（非ふるえ熱産生）の促進を基本に据える際し、本発明においては、従来からの、nSTの組織としては相対的に小さいBAT内MCのプロトンリーク亢進に加え、最近その存在が遺伝子レベルで確認されたばかりの、主要nSTの組織とされる骨格筋及びWATに高濃度に発現するUCPサブタイプ、UCP-3とUCP-2、の機能を亢進させる手段を創造して、これに当て、依ってその効率を飛躍的に向上させることを意図している。UCPサブタイプmRNAは全てBATに発現すること、並びに共役異性化魚油がBAT内UCPの発現を亢進させることに着目して、新たにUCPサブタイプの各々のmRNAのアッセイ系を導入して、共役異性化魚油飼養ラットのBATを採取して全サブタイプmRNAを検索することが主要な課題となる。即ち、本発明は、ヒトを含む哺乳動物の生体内エネルギー消費調節系の主要系に属するnSTの主要な組織である骨格筋及びWAT、組織量は小さいものの単位当たりの機能が極めて大きいBAT、各々のMCのプロトンリークを特異的に亢進させることでnST機能を増進させる作用を有する共役異性化された高度不飽和脂肪酸類及び／又はその誘導体を含む物質、該物質を有効成分として含む抗肥満（内臓脂肪蓄積抑制）・内臓蓄積脂肪低減化剤、並びに該物質を有効成分として含む抗肥満・内臓蓄積脂肪の低減化機能を付した特定保健用食品（機能性食品）を含む一般加工食品、及び該抗肥満・内臓蓄積脂肪の低減化機能を付与した飼料

を提供することを課題とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決することを目指して鋭意研究を積み重ねた結果、以下の事項により上記課題が解決され得ることを見出し、本発明を完成するに至った。即ち、本発明は、以下の事項をその基本構成とするものである。

(1) 共役異性化された高度不飽和脂肪酸類及び／又はその誘導体を含む物質であって、ヒトを含む哺乳動物及び鳥類の非ふるえ熱産生 (nonshivering thermogenesis ; nST) の主要組織、骨格筋、白色脂肪組織 (WAT)、褐色脂肪組織 (BAT) 等の細胞中のミトコンドリア (MC) の脱共役呼吸乃至MC内膜でのプロトンリーク (proton leak) を特異的に亢進する作用を有する共役異性化高度不飽和脂肪酸類及び／又はその誘導体を含む物質。

(2) 上記作用を有する成分が、共役異性化された高度不飽和脂肪酸 (HUF A) 類である前記 (1) 記載の物質。

(3) 上記作用を有する成分が、HUF A誘導体の酸化生成物のフランHUF A誘導体である前記 (1) 記載の物質。

(4) 主要なnST組織の骨格筋、白色脂肪組織、褐色脂肪組織等の、ミトコンドリア含有細胞に特異的に作用して該細胞中の脱共役蛋白質同族体 (UCP homologue) の発現量を顕著に増大させる作用を有する前記

(1)、(2) 又は (3) 記載の物質。

(5) 前記 (1)、(2) 又は (3) 記載の、nSTの主要組織である骨格筋、WAT及びBAT等の細胞中のミトコンドリア (MC) の脱共役呼吸乃至プロトンリークを特異的に亢進する作用を有する物質を有効成分として含む抗肥満（内臓脂肪（特に、腸管膜脂肪）蓄積抑制）・内臓（特に、腸管膜）蓄積脂肪低減化剤。

(6) 前記 (1)、(2) 又は (3) 記載の、nSTの主要組織である骨格筋、WAT及びBAT等の細胞中のミトコンドリア (MC) の脱共役呼吸乃至プロトンリークを特異的に亢進する作用を有する物質を有効成分として含む抗肥満（内臓脂肪（特に、腸管膜脂肪）蓄積抑制）・内臓（特に、腸管膜）蓄積脂肪低減化機能を付した食品。

(7) 前記 (1)、(2) 又は (3) 記載の、nSTの主要組織である骨格筋、WAT及びBAT等の細胞中のミトコンドリア (MC) の脱共役呼吸乃至プロトンリークを特異的に亢進する作用を有する物質を有効成分として含む抗肥満（内臓脂肪（特に、腸管膜脂肪）蓄積抑制）・内臓（特に、腸管膜）蓄積脂肪低減化機能を付した飼料。

【0011】

【発明の実施の形態】以下、本発明について更に詳細に説明する。本発明の、nST組織のMCのプロトンリー

ク (proton leak) を特異的に亢進する作用を有する物質は、共役異性化された高度不飽和脂肪酸類及び／又はその誘導体を含む物質である。本発明で云う物質とは、これらの成分を含む適宜の配合物、組成物、混合物などに限らず、これらの成分そのものであってもよい。また、共役異性化された高度不飽和脂肪酸類とは、高度不飽和脂肪酸類を適宜の手段で共役異性化させたものである。また、本発明の上記物質は、共役異性化された高度不飽和脂肪酸類と同様の機能を有するものであれば、合成品に限らず、天然由来の共役異性化高度不飽和脂肪酸類の濃縮物、抽出物、精製品、分離品、加工品などであってもよい。具体的には、例えば、天然に由来する3価以上の高度不飽和脂肪酸 (HUF A) 及び誘導体、 α -リノレン酸、 γ -リノレン酸、ビスホモ γ -リノレン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキソエン酸等の高度不飽和脂肪酸及び混合物、アシル基の少なくとも1つが、HUF A及びそれらの混合物の残基であるトリアシルグリセロール、ジアシルグリセロール及びモノアシルグリセロール及び混合物、アシル基の少なくとも1つが、HUF A及びそれらの混合物の残基であるグリセロリン脂質類、例えば、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン類、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール類、ホスファチジルグルセロール類、カルジオリピン、ホスファチジン酸、ビスホスファチジン酸、ピロホスファチジン酸、エタノールアミンプラスマローゲン等のプラスマローン型リン脂質、リゾレシチン、リゾホスファチジルエタノールアミン等のリゾ型リン脂質、並びに、ミエリン、セラミドホスホエタノールアミン等のスフィンゴリ脂質等及びその混合物、ナトリウム、カリウム、カルシウムなどの安全なHUF A塩、メチル、エチル、ブチル等脂肪酸アルコールの安全なHUF A及びそれらの混合物のエステル及びグルコース等の単糖類、スクロース等の二糖類及びキシリトール等のオリゴ糖などの安全なHUF A及びそれらの混合物のエステル類、等を適宜の手段で共役異性化させたもの及びそれと同効の物質が例示される。本発明において、共役異性化された高度不飽和脂肪酸類とは、具体的には、例えば、共役化HUF A及び／又はそれらの混合脂肪酸、HUF A及びそれらの混合物結合型共役化トリアシルグリセロール、例えば、共役化魚油、共役化アマニ油等、1-及び／又は3-共役化HUF A及びその混合物結合型ジアシルグリセロール、1-及び／又は2-共役化HUF A及びその混合物結合型ジアシルグリセロール、1-及び／又は2-共役化HUF A及びその混合物結合型モノアシルグリセロール、1-及び／又は2-共役化HUF A及びその混合物結合型グリセロリン脂質、例えば、1-及び／又は2-共役化HUF A及びその混合物結合型ホスファチジルコリン等、共役化HUF A及びその混合物置換リゾレシチン等、共役化HUF A及びその混合物のナトリウム塩類

等、共役化HUF A及びその混合物のエチルエステル類等、並びに共役化HUF A及びその混合物の砂糖エステル類、等を意味する。本発明の上記物質の原料としては、天然脂質、とりわけ、自然界に存在する高度不飽和油脂、例えば、魚油等の水産油脂、並びにアマニ油、シソ油等の天然由来の植物油脂、麻実油、あまに油、えごま油、なたね油、オイシカ油、くるみ油、けし油、ざくろ種子油、大豆油、きり油、月見草種子油、ゴム核油、ライム種子油、アブラ菜科種子油、アマ種子油、トール油、ほうせんか油、イワシ油、うなぎ油、かつお油、さけ油、さけ卵油、サバ油、サンマ油、ニシン油、ブリ油、アジ油、マグロ油、マス油、マス卵油、メンヘーデン油、ジャックマツカレル油、サメ肝油、イカ肝油、イワシ肝油、カジキ肝油、カツオ肝油、スケソードラ肝油、タラ肝油、ブリ肝油、マグロ肝油、アザラシ油、アシカ油、各種鯨油等が好適なものとして例示されるが、特にこれらに限られるものではなく、これらと同等もしくは類似のものであれば、その種類に限らずに適宜使用することができる。上記原料を共役異性化する方法は、化学的処理法、ルーメンバクテリア発酵法、動物腸内細菌発酵法、脱水素酵素処理法及び金属触媒法、例えば、共役化該HUF A及びそのアルカリ塩が得られる苛性ソーダ及びカリ存在下での加熱法、該HUF Aグリセライド類の共役異性体得られるナトリウムあるいはカリウム t -ブチルアルコキサイド存在下での加熱法、反芻動物のルーメンバクテリア、例えば、*Butyrivibrio fibrisolvens* や、他の動物の無害な腸内細菌類によるHUF A及びその誘導体の共役異性化法、酵素反応、生体反応、細胞機能、遺伝子機能等の生物化学的反応を利用した共役異性化法、ハイドライドを形成し易いパラジウム、チタン、ジルコニウム、マグネシウム及びこれらの合金、 Mg_2Ni 、 $LaNi_5$ 、 $TiFe$ 等を触媒として加熱処理する方法などが例示されるが、これらに限定されるものではなく、共役異性化に有効な方法であればその種類を問わず利用することができる。尚、本発明においては、共役異性体の定量については、該HUF A誘導体の共役異性体には、二重結合位置異性体とこれらの各々の立体異性体 (シス、トランス) が存在し、その構造の特定とその生成量の定量は極めて困難であることに鑑み、全共役二重結合を定量することとしている。

【0012】また、本発明において、共役異性化された高度不飽和脂肪酸類の誘導体とは、上記高度不飽和脂肪酸類と同様の機能を有する誘導体であれば、合成品に限らず天然品及びその加工品であってもよい。具体的には、例えば、多価不飽和脂肪酸、共役リノール酸及びその混合物 (以下、CLA)、ナトリウム塩等の塩類、エチルエステル等のエステル類、少なくとも1つのアシル基がCLA残基であるトリアシルグリセロール類、同じくジアシルグリセロール類、同じくモノアシルグリセロール類及びそれらの混合物、少なくとも1つのアシル基

がCLA残基であるグリセロリン脂質類とその混合物、及び上記共役異性化HUF A及びその混合物の誘導体、例えば、遊離酸、塩類、エステル類、アシルグリセロール類及びその混合物、グリセロリン脂質類とその混合物、等の生体内及び外因性の酸化生成物のフラン酸誘導体が例示される。例えば、北海道産秋鮭の新鮮な精巣からの内因性フラン酸誘導体は、表6に示したように6種類の異性体の混合物であり、また、最も単純な構造の共役化脂肪酸のCLAの自動酸化による外因性フラン酸も、表6と類似の数種の異性体 (M. P. Yurawecz et al., *Lipids*, 30 (7), 595-598 (1995))、を含むものである。共役化FUF Aには、抗酸化機能があることが知られており、容易に酸化されてフラン誘導体を生成し、フラン脂肪酸はヒトを含む動物や魚類、植物等に広く分布している (M. P. Yurawecz et al., *Lipids*, 30 (7), 595-598 (1995))。特に、魚類においては、季節によって、その肝臓及び精巣脂質中に全脂質の半分以上の極めて高含有率でフラン脂肪酸が存在することが確認されている。更に、ラットへの投与で、フラン脂肪酸が小腸から吸収されて血中に含まれていることが確認されている (D. M. Sand, et al., *Biochim Biophys Acta* 751, 455-461 (1983))。魚類精巣中のフラン脂肪酸は、雌の産卵期の前にその含有量が極大となり、それ以降は速やかに消失する (D. M. Sand, et al., *Biochim Biophys Acta* 793, 429-434 (1984))。該フラン脂肪酸類の生理作用に関しては、過酸化による細胞損傷の防御、等の報告がある (M. P. Yurawecz *INFORM* 7(2), 156 (1996))。フラン脂肪酸類の自動酸化生成物にはバクテリアのウリアーゼ (Urease) の阻害作用があり (G. Rosenblatt, et al., *J Am Oil Chem Soc.* 70, 501-505, (1993))、また、リポキシゲナーゼ-1 (lipoxygenase-1) による酸化生成物にも生理作用が示唆されている (R. F. Boyer., et al., *Chem Phys Lipids* 25, 237-246 (1979))。本発明の上記物質は、例えば、医薬品、食品、飼料などの有効成分として使用されることから、その目的用途に応じて適宜のレベルに精製すればよい。特に、特定保健用食品 (機能性食品) などの加工食品には、比較的精製したものを、飼料などに用いる場合は、原材料が天然油脂、例えば、イワシ油、あまに油、えごま油、なたね油、メンヘーデン油、イカ肝油、カツオ肝油、等であることから、粗製製品のレベルで使用する事が可能である。

【0013】本発明の上記物質は、前述の共役異性化された高度不飽和脂肪酸類を含む物質であり、例えば、共役化カツオ油、共役化マグロ油、共役化サケ卵油、共役化アマニ油、共役化キリ油、共役化大豆油、共役化えごま油、等であってもよいが、食用油脂そのものでないこと、食用油脂と別異のものであることは、例えば、パーム油、ヤシ油、ラード、牛脂などの一般的な食用油脂にその作用が認められないことから明らかである。本発明

においては、上記有効成分の有用性を明らかにする為に、後記する実施例に具体的に示されているように、病態マウスでの共役異性化魚油投与、共役異性化DHA結合型魚油、そして、典型的 ω -3HUF AのDHA共役異性体の典型的酸化生成物のフラン酸結合型特殊魚油、の各々を然るべき実験動物に投与して、内臓脂肪量とUCP並びにUCP mRNAを測定した。その結果、対照のラード区 (必須脂肪酸強化) に対し、有意に、BATのUCPの発現量が多く且つ内臓 (特に腸管膜) 脂肪量の少ないものは、フルフリル化油脂 (フラン脂肪酸含有)、共役異性化型DHA結合中性油脂であった。

【0014】また、共役異性化魚油投与病態マウスのBATに発現しているUCPサブタイプmRNAの濃度 (対対照ラード区) は、UCP-2が高濃度に、UCP-1とUCP-3が低濃度に発現しており、主要nST組織における一般的な各mRNAの発現パターンの、骨格筋 (3型が高濃度で2型は中等度で1型は発現せず)、WAT (2型が比較的高濃度で3型が低濃度で1型は発現せず) 及びBAT (1型が高濃度で2型及び3型は低濃度)、に当てはめて考えると、本発明の有効成分投与マウスのnST組織内発現UCPサブタイプmRNAの濃度は、BATにUCP-2が高濃度に、WATにUCP-2が高濃度にそして骨格筋にはUCP-3が高濃度に発現しているものと推定される。共役異性化DHA結合魚油投与ラットの内臓 (特に腸管膜) 脂肪は言うまでもなく体重までが有意に低下している結果がこの推定の妥当性を強く示唆している。

【0015】nSTの組織内細胞のMCで脂肪及び糖が燃焼するためにはUCPファミリーの発現が不可欠であるが、本発明の有効成分は、前記のように、該組織内細胞のUCPファミリー発現量を顕著に増大させる作用を有することから、この分子レベルでの知見から見て、内臓脂肪蓄積抑制及び蓄積内臓脂肪の低減化に有効であることが裏付けられる。本発明の上記有効成分は、ヒトを含む哺乳動物のnSTに関与する骨格筋等の非ふるえ熱産生組織細胞中のMCの内膜貫通型蛋白質のUCP同族体の発現量を増大させ、上記細胞中のMCのプロトンリークを特異的に亢進させる作用を有する。本発明の上記物質は、天然脂質由来HUF Aの共役異性体及びその酸化生成物であるフラン酸並びにその誘導体で、上記の様に、骨格筋等のnST組織細胞中のUCP同族体の発現量を著しく増大させる高UCP発現物質として、その発現活性を指標として同定及び分離・精製することができる。本発明の上記成分を有効成分として、特に抗肥満に著効を有する内臓蓄積脂肪低減化剤乃至内臓脂肪蓄積抑制剤を調製することができる。当該低減剤乃至抑制剤の担体としては、その使用形態に応じて、適宜の充填剤、結合剤、増量剤、崩壊剤、表面活性剤、防湿剤、賦形剤、希釈剤などを使用することができる。製剤形態は、その使用目的に応じて適宜決定すれば良く、特に限定さ

れないが、例えば、錠剤、顆粒剤、粉末剤、丸剤、カプセルなどの固剤や、液剤、懸濁剤、乳剤などが例示される。かくして得られる内臓蓄積脂肪低減化剤乃至内臓脂肪蓄積抑制剤は、経口投与が望ましく、その投与量は、投与する者の症状等に応じて適宜選択される。従って、投与量、投与回数などは特に限定されない。

【0016】また、本発明の上記物質を有効成分として、通常の食品乃至特定保健用食品（機能性食品）を調整することができる。また、該物質を各種食品の添加物として使用することもできる。上記食品の種類としては、特定保健用食品に限らず、通常の健康食品はもとより、例えば、ケーキ、菓子、チョコレート、和菓子、食肉製品、アイスクリーム、魚肉製品、調理食品など、本来的に肥満を助長するとされる食品に使用することも可能である。本発明の上記物質の上記食品への配合量、配合形態などは、食品の種類、製品コンセプト、製品形態などに応じて適宜選択される。通常は、食品中、一回の摂取で100～1000mg程度の摂取が可能なレベルで、配合するのが好適なものとして例示される。更に、本発明の上記物質を飼料に配合することによって、家畜などの内臓脂肪蓄積抑制機能乃至内臓蓄積脂肪低減化機能を付した飼料を調製することができる。本発明の上記物質が配合される飼料としては、例えば、牛、豚、鶏等の家畜用飼料などが例示されるが、特に、食肉牛などの家畜用飼料が好適なものとして挙げられる。本発明の上記物質の飼料への配合量、配合形態などは、飼料の種類、家畜の飼育状況などに応じて適宜選択される。例えば、食肉牛飼育飼料の場合、飼料中50～500mg程度配合することが好ましい。

【0017】

【実施例】次に、実施例に基づいて本発明を具体的に説明するが、本発明は当該実施例によって何ら限定されるものではない。尚、前記の他の共役異性化された高度不飽和脂肪酸類及び／又はその誘導体を含む物質について同様の試験をしたところほぼ同様の効果が得られた。

実施例1

1. 試料の調製

(1) DHA高含有トリグリセリドの共役異性化物の調製

マグロ眼窩油を原料として、DHA含量が45～50%となるまでDHA高含有トリグリセリド(TG)を精製、調製した(以下、マグロ精製TGと記載する)。調製したマグロ精製TG約120gにジメチルホルムアミドを加えて200mlとした。次いで、全量を500mlの共栓付三角フラスコに移し、これにt-カリウムブトキシド($(\text{CH}_3)_3\text{COK}$)を約12g添加し、フラスコ内の空気を窒素で置換した後、30℃で1時間インキュベートを行った。インキュベート後、溶液を酸性とし、反応物をn-ヘキサンで抽出した。抽出物を水洗後、脱水し、次いで、減圧下で溶媒をできるだけ除去し

た。得られた反応生成物をケイ酸カラムクロマトグラフィーに供し、共役異性化TGを調製した。なお、ケイ酸カラムの溶媒には、n-ヘキサン、5%ジエチルエーテル含有n-ヘキサン、及び20%ジエチルエーテル含有n-ヘキサンを用い、20%ジエチルエーテル区分を回収した。このような操作により得られた共役異性化TGは、元の試料油脂(マグロ精製TG)重量の約40～50%であった。上記の異性化並びに精製は計5回行い、約250gの共役異性化TGを得た。

10 【0018】(2) 共役異性化TGの定量

上記の操作で得られたTGについて、その共役酸含量を公定法(日本油化学会編:基準油脂分析試験法, 2.

4. 15-71)を用いて測定した。10～20mgの油脂を50mlメスフラスコに精秤し、これをシクロヘキサンでメスアップした後に、233nm、262nm、268nm、274nm、308nm、315nm、322nmのUV吸収を測定し、以下の式に従って共役酸含量を算出した。

$$k\lambda = A\lambda / (b \times c)$$

20 (: λ における吸光度 ; b : セルの長さ [cm] ; c : 濃度 [g/l])

$$k_2 = k_{233} - k_0$$

$$k_3 = 2.8 [k_{268} - 1/2 (k_{262} + k_{274})]$$

$$k_4 = 2.5 [k_{315} - 1/2 (k_{308} + k_{322})]$$

エステルの場合、 $k_0 = 0.07$

【0019】共役ジエン、共役トリエン及び共役テトラエンの含量(%)は、次の式から求められる。

$$\text{共役ジエン} = 0.91 k_2$$

$$\text{共役トリエン} = 0.47 k_3$$

30 共役テトラエン = $0.45 k_4$

上記の式に従って試料油(マグロ精製TG)及び異性化TGの共役酸含量について分析したところ、試料油では共役ジエン含量が3.3%で、共役トリエン及び共役テトラエンはともに0%であった。また、異性化TGは、共役ジエン含量が27.3%、共役トリエン含量が6.8%、共役テトラエン含量が4.4%、合計の共役酸含量が38.3%であった。

【0020】なお、上記共役異性化TGの逆相HPLC分析を行ったところ、DHAの共役異性体が共役型不飽和脂肪酸の主要脂肪酸であることがわかった。HPLCのカラムにはODS(野村科学、Develosil ODS-UG-5)を用い、検出はUV検出器を用いて235nmの吸収を測定することによって行った。次に、試料油及び共役異性化TGのGC分析を行った。GCのカラムにはOmegawax320を用い、カラム温度200℃として分析を行った。その結果、試料油のDHA含量は約45%となり、高度不飽和脂肪酸のほとんどがDHAであった。一方、共役異性化TGではDHAは約2%しか検出されず、試料油中のDHAのほとんどが異性化されたものと考えられた。この結果は、UV吸収による共役酸総量(約40

%)の結果とほぼ一致していた。

【0021】2. 実験動物及び実験飼料

7週齢のSprague-Dawley系雄ラットを用い基礎飼料(F-2、船橋農場(株))で1週間予備飼育後、1区7頭として平均体重が等しくなるように下記の3区に分け、7週間飼育した。飼育環境は温度22~24℃、湿度50~60%に調節し、明暗は12時間周期(明期8:00~20:00、暗期20:00~8:00)とした。飼料は制限給餌とし、1週毎に体重を測定した。試験に用いた飼料の基本組成を表1に示す。たんぱく質、糖質*10

	試 験 区		
	ラード区	マグロ精製TG区	共役酸区
カゼイン	20.0%	20.0%	20.0%
コーンスターチ	43.8%	43.8%	43.8%
シュクロース	15.0%	15.0%	15.0%
セルロースパウダー	5.0%	5.0%	5.0%
混合ミネラル*1	4.0%	4.0%	4.0%
混合ビタミン*1	2.0%	2.0%	2.0%
メチオニン	0.2%	0.2%	0.2%
リノール酸エチル	1.0%	1.0%	1.0%
ラード	9.0%	7.0%	7.0%
マグロ精製TG		2.0%	
共役酸*2			2.0%

*1:オリエンタル酵母工業社製

*2:マグロ精製TGの共役異性化

【0023】3. 動物処理方法及び分析方法

7週間飼育後、20時間絶食させ、エーテル麻酔下で開腹し下大静脈から採血して屠殺した。続いて腸管膜脂肪、腎周囲脂肪、精巣周囲脂肪、及び肩甲骨間の褐色脂肪を採取して重量を測定し、褐色脂肪はUCP量の測定に供した。血液からは常法により血漿を得、和光純薬工業社製臨床検査用試験を用いて、血清中のトリグリセリド、コレステロール、及びリン脂質濃度を測定した。UCP量の測定は下記に示す方法により行った。

【0024】UCPタンパクの抽出操作:ラットの肩甲骨間より摘出したBATを300mM sucrose (10mM Tris-HCl, pH7.5、2mM EDTAを含む)でホモゲナイズし、冷却卓上遠心機にて3,100rpm、4℃、5min遠心後、更にその上清を12,000rpm、4℃、10min遠心した。得られた沈殿(ミトコンドリア画分)をサンプルとした。

【0025】電気泳動とウエスタンブロッティング:ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、11%分離ゲルにて行い、各レーンあたりサンプルタンパク50μgを分析

*等の成分は同一とし、脂質としても各区とも10%となるよう調整した。すなわち、各試験区とも必須脂肪酸としてリノール酸エチルを1%含み、対照であるラード区は9%のラードを、マグロ精製TG区はマグロ精製TGを2%(残り7%はラード)、共役酸区はマグロ精製TGの共役異性化物を2%(残り7%はラード)を含むよう調整した。

【0022】

【表1】

に供した。泳動条件は、100Vで10分間、その後200Vで1時間泳動した。膜(Hybond-C、アマーシャム社製)へのトランスファーは、セミドライ方式によって135mA(2.5mA/cm²)、30分間で行った。膜のブロッキングは、1%スキムミルク溶液に1時間以上浸漬して行った。次に、膜をラットUCPに対するウサギ抗体(1次抗体、3000倍希釈)と反応させた後、洗浄し、更にウサギIgG-ペルオキシダーゼ標識(2次抗体)と反応させた。洗浄後、UCPのバンドを化学発光法検出試薬(デュボン社製)にてX線フィルム上で検出した。フィルム上のバンドの濃度をスキナーで読み取りコンピューターにて数値化した。

【0026】4. 結果

UCPのみに対照であるラード区を100として、その他は各試験区の各測定値を表2に示す。飼料摂取量に各試験区間で差はなかったにもかかわらず、飼育後の体重はマグロ精製TG区、共役酸(マグロ精製TGの共役異性化物)区で対照ラード区に比べて有意に低くなっていた。飼育期間中には各試験区とも軟便、下痢などの症状は見られず、便の量にも差は見られなかった。UCP量

はマグロ精製TG区で対照ラード区の約1.5倍、共役酸区で約2.0倍の増加を示した。また、体重当たりの腸管膜脂肪及び腸管膜脂肪、精巣周囲脂肪、腎周囲脂肪を合わせた腹腔内脂肪の総量において、共役酸区は対照ラード区と比較して有意に少なく、マグロ精製TG区にも少ない傾向が認められた。更に、トリグリセリド等の血漿脂質濃度は、共役酸区、マグロ精製TG区とも、ラード区と比較して有意に低いあるいは低い傾向であった*

*た。DHA高含有マグロ精製TG（共役酸含量3.3%）にも、BAT中のUCPの発現を増大させ、内臓脂肪の蓄積を抑制する作用が認められるが、これを原料として調製した共役異性化油（共役酸含量38.3%）はかかる作用を顕著に発現することが明確となった。

【0027】

【表2】

	ラード群	マグロ精製TG群	共役酸群
体重(g)	520.4 ± 30.0 b	495.7 ± 15.4 a	477.4 ± 17.3 a*
飼料摂取量(%)	1059 ± 78	1032 ± 54	1038 ± 28
体重当り腸管膜脂肪(%)	1.08 ± 0.20 b	1.00 ± 0.19 ab	0.79 ± 0.14 a
体重当り腹腔内脂肪合計(%)	5.43 ± 1.03 b	4.54 ± 0.78 ab	4.11 ± 0.86 a
体重当り褐色脂肪(%)	0.077 ± 0.017	0.080 ± 0.020	0.069 ± 0.013
UCP	100 ± 9 b	151 ± 18 a	198 ± 21 c*
血漿トリグリセリド(mg/dL)	113.8 ± 31.6 b	81.5 ± 16.7 a*	72.0 ± 27.5 a
血漿総コレステロール(mg/dL)	79.2 ± 24.6	51.7 ± 16.1	61.4 ± 17.6
血漿リン脂質(mg/dL)	118.3 ± 32.1 b	88.0 ± 16.5 ab	88.7 ± 25.4 ab
血漿脂質合計(mg/dL)	311.2 ± 68.5 b	199.2 ± 41.3 a*	232.1 ± 64.9 ab

数値は平均±標準偏差を表す。

腹腔内脂肪合計：腸管膜脂肪、精巣周囲脂肪、腎周囲脂肪量の合計

UCP：対照ラード区を100とした時の相対値で表示

共役酸群：マグロ精製TGの共役異性化油

共通の符号の付いていない文字間で有意差あり (p<0.05), *p<0.01

【0028】実施例2

共役異性化魚油の摂取によるBAT中のUCPサブタイプの発現量の測定とその評価
従来、UCPはBATのミトコンドリア内膜上に特異的に存在し、BATの熱産生機構を担うとされてきた。しかし、前記のように、昨年（1997年）半ばに従来のUCP（以下UCP-1と記載する）と相同性が高く、同様の機能を有すると思われるUCP-2及びUCP-3が相次いで発見され、ファミリーを形成していることが明らかとなった。UCPファミリーは寒冷曝露や食餌によってその発現が誘導されることは既に報告されているが、UCP-2、-3に関してはそれらの詳細は明らかではない。実施例1で明らかとなった、共役異性化H UFA含有魚油によるnST機能亢進が、UCPサブタイプのいずれの発現亢進によるものかを明らかにするた
めに、実施例1と同一の共役異性化魚油を、食餌誘発性※

※肥満を引き起こし易い、C57BL系マウスに投与して、UCP同族体の各サブタイプの遺伝子発現濃度の定量を、河田らのノーザンブロット解析法で実施した (Biochem. J. 293, 807-812, 1993)。マウスの飼育条件及び食餌条件は、表3に記載した。

飼育条件：8週齢のC57BL/6系マウス（雄）を1群8匹の3群に分け、1週間基礎飼料により予備飼育をした後、14週齢までの5週間本飼育 (pair-feeding) を行った。

食餌条件：オレイン酸のみを含む食餌をコントロール食（低脂肪食）とし、更にラード、共役異性化魚油を添加した食餌をラード食、共役異性化魚油食（高脂肪食）とした。

【0029】

【表3】

飼 料 組 成

	(g/100g diet)		
	低脂肪食区	ラード区 (高脂肪食)	共役異性化魚油区 (高脂肪食)
カゼイン	20	27.1	27.1
α -コーンスターチ	58.2	28.1	28.1
砂糖	10	10	10
ミネラル	3.5	3.5	3.5
セルロース	5	5	5
ビタミン類	1	1	1
D, L-メチオニン	0.3	0.3	0.3
オレイン酸	2	2	2
ラード	-	23	-
共役異性化魚油	-	-	23

【0030】体重や脂肪蓄積量などの測定結果を表4にまとめた。その結果、腎周囲、副精巣及び腸管膜脂肪組織の重量が、ラード食餌に比べて共役異性化魚油食餌において有意に低下していた。また、興味深いことに、この共役異性化魚油の効果は、低脂肪食（重量比2%）に匹敵するものであった。そこで、更に、この共役異性化魚油の効果のメカニズムを解析するために、BAT中のUCPファミリー各サブタイプ（UCP-1、-2、-3）mRNA発現量を比較検討した。その結果を図1に示した。ここでGAPDHは、mRNA分析のための内部標準遺伝子として用いている。図1から明らかのように、共役異性化魚油食餌においてUCP-2遺伝子の発現が顕著に増大していた。従来知見から、UCP発現の増大は、BATを支配する交感神経末端から分泌され*

*るノルアドレナリンによって制御され、これはおもにUCP-1の増加をもたらすことが明らかとなっている。上記のように、本実験において共役異性化魚油は、UCP-2遺伝子の特異的に増強することが判明したことから、共役異性化魚油によるBATの機能亢進作用は交感神経系を介するものではなくて、むしろ共役異性化魚油成分のBATへの直接的な作用であることが推察された。UCP-2は、UCP-1とは異なり、BATのみならずWATや骨格筋等NSTの主要組織に広汎に分布することから、ヒトの抗肥満に対し、共役異性化HUF A誘導体（魚油）が極めて有効であることを示すものである。

【0031】

【表4】

油脂の Maus 脂肪組織重量と体重に及ぼす影響

	低脂肪食区	ラード区 (高脂肪食)	共役異性化魚油区 (高脂肪食)
体重 (g)	25.7 ± 0.43	26.7 ± 0.60	26.1 ± 0.26
飼料摂取量 (kcal)	541.3 ± 10.7	541.9 ± 14.5	540.0 ± 8.5
腎周囲WAT (g/100g 体重)	0.81 ± 0.06 a	1.01 ± 0.07 b	0.72 ± 0.05 a
副精巣WAT (g/100g 体重)	1.89 ± 0.06 a	2.35 ± 0.09 b	1.44 ± 0.07 c
腸管膜WAT (g/100g 体重)	0.87 ± 0.06 a	1.25 ± 0.07 b	0.94 ± 0.05 a
肩甲骨間BAT (g/100g 体重)	0.86 ± 0.06	1.12 ± 0.06	1.14 ± 0.05

数値は、平均±標準偏差（8匹）を示す。

同一行の数値で、異なる肩記号間で有意差（P<0.01）

【0032】実施例3

1. 試料の調製

(1) DHAエチルエステルの共役異性化物の調製

DHAエチルエステル（99% ハリマ化成（株）製）
100g にジメチルホルムアミド80mlを加え、更に、カリウムt-ブトキシド（ $(\text{CH}_3)_3\text{C}-\text{OK}$ ）

を 31.5 g (対 DHA エチルエステル等モル量) を添加して全量を 500 ml の共栓付三角フラスコに移し、フラスコ内の空気を窒素で置換した後、30℃で 1 時間インキュベートした。インキュベート後、反応液を 2 N 塩酸で酸性とし、n-ヘキサンで抽出した。抽出液を水洗後、脱水し、次いで、減圧下で溶媒をできるだけ溜去した。得られた濃縮液 (反応生成物) をケイ酸カラムクロマトグラフィーに供し、共役異性化 DHA トリグリセライドを調製した。なお、ケイ酸カラムの溶媒には、n-ヘキサン、5% ジエチルエーテル含有 n-ヘキサン及び 20% ジエチルエーテル含有 n-ヘキサンを用い、20% ジエチルエーテル画分を回収した。このような操作により得られた共役異性化 DHA エチルエステルの収率は、49% であった。

【0033】 (2) 共役異性化 DHA エチルエステルの定量

上記の操作で得られたエチルエステルについて、その共役異性化酸含量を、実施例 1 と同様に公定法により測定した。原料の DHA エチルエステル及びその異性化エチルエステル、各々の共役異性化酸含量は、原料 DHA エチルエステルでは、共役ジェン、共役トリエン及び共役テトラエンとも 0%、一方異性化エステルは、共役ジェン 83.0%、共役トリエン 9.7% 及び共役テトラエンが 7.0% で、DHA の全量 (99% 強) が共役異性化されたことが分かった。なお、原料の DHA エチルエステルとその共役異性化 DHA エチルエステルの逆相 HPLC (カラム: ODS (野村科学, Develosil ODS-UG-5)) 分析を行い、DHA エチルエステルの脂肪酸が DHA であり、異性化エチルエステルでは、シングルピークのみが検出され、DHA エチルエステル中の DHA がほぼ完全に共役異性化されていることが確認された。更に、UV 吸収法による共役酸量の測定結果 (ほぼ 100%) と一致した。

*

	対 照 区	共役酸エチル群
体重 (g)	515.8 ± 29 b	465.3 ± 19.5 a†
飼料摂取量 (g)	1041 ± 67	1035 ± 36
体重当り腸管膜脂肪 (%)	1.01 ± 0.20 b	0.75 ± 0.18 a
体重当り腹腔内脂肪合計 (%)	5.29 ± 0.93 b	4.15 ± 0.73 a
体重当り褐色脂肪 (%)	0.073 ± 0.015	0.075 ± 0.014
UCP	100 ± 8	178 ± 16 a†

数値は、平均 ± 標準偏差を表す。

腹腔内脂肪合計: 腸管膜脂肪、精巣周囲脂肪、腎周囲脂肪量の合計

UCP: 対照区を 100 とした時の相対値で表示

共通の符号の付いていない文字間で有意差あり (p < 0.05), * p < 0.01

【0039】 実施例 4

1. 試料の調製

(1) フラノイド脂肪酸 (以下、F 酸) エチルエステル

* 【0034】 2. 実験動物及び実験飼料

1) 実験動物とその飼育方法

実施例 1 と同様

【0035】 2) 実験飼料

原料 DHA エチルエステル 0.5% にラードを 8.5% を加えて対照区とし、共役化 DHA エチルエステル 0.5% にラードを 8.5% を加えて、共役 DHA エチル区とした以外は、実施例 1 に準じた。

【0036】 3. 動物処理方法及び分析方法

7 週間飼育後、20 時間絶食させ、エーテル麻酔下で開腹し下大静脈から採血して屠殺した。続いて腸管膜脂肪、腎周囲脂肪、精巣周囲脂肪、及び肩甲骨間の褐色脂肪を採取して重量を測定し、褐色脂肪は UCP 量の測定に供した。UCP 量の測定は、実施例 1 と同様に行った。

【0037】 4. 結果

UCP は対照区を 100 として、その他は試験区の測定値を表 5 に示す。飼料摂取量に試験区間で差はなかったにもかかわらず、飼育後の体重は、共役酸 (DHA エチルの共役異性化物) 区で対照区に比べて有意に低くなっていた。飼育期間中には各試験区とも軟便、下痢などの症状はみられず、便の量にも差はみられなかった。UCP 量は、共役異性化 DHA エチルが対照区に対し、約 1.8 倍の増加を示した。また、体重当たりの腸管膜脂肪及び腸管膜脂肪、精巣周囲脂肪、腎周囲脂肪を合わせた腹腔内脂肪の総量において、共役酸エチル区は対照区と比較して有意に少なく、共役異性化 DHA エチルエステルが、UCP 発現量を増大させることによって腹腔内脂肪はもとより、腸管膜脂肪蓄積抑制及び腸管膜蓄積脂肪低減化機能を発揮していることを示している。

【0038】

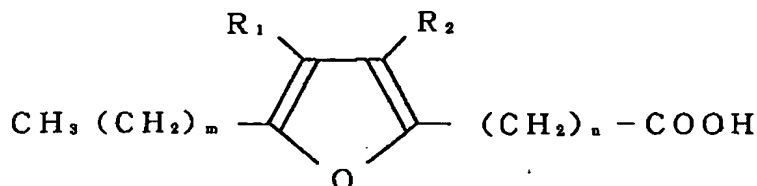
【表 5】

の調製と分析

北海道産秋鮭 (*Oncorhynchus keta*)

の新鮮な白子 (精巣) をフリーズドライし、ミキサーで

十分に粉碎後、エタノールに浸漬して、振とうし、不溶物を濾別して、エタノール抽出液を得た。抽出液からエバポレーターで、エタノールを溜去し、オイル状の脂質画分を得た（収率2.5%）。該オイルをケイ酸カラムクロマトグラフィーに供し、実施例1と同様に操作してF酸トリグリセリド画分を分離した。該画分を常法に従い酸触媒を用いてエチルエステル化して、同上カラムを通して精製エステルとした。該エステルをアセトニトリルに溶解し、太田ら（Chromatography 15, No. 4, 250-253（1994））の方法に従い逆相HPLC（カラム：Z*10



【0041】

【表6】

フラノイド脂肪酸の構造

	m	n	R ₁	R ₂
F ₀	4	6	CH ₃	CH ₃
F ₁	2	8	CH ₃	CH ₃
F ₂	4	8	H	CH ₃
F ₃	4	8	CH ₃	CH ₃
F ₄	2	10	CH ₃	CH ₃
F ₅	4	10	H	CH ₃
F ₆	4	10	CH ₃	CH ₃
F ₇	4	12	H	CH ₃
F ₈	4	12	CH ₃	CH ₃
F ₂ '	2	10	H	CH ₃
F ₆ '	2	12	CH ₃	CH ₃

【0042】（2）F酸の自動酸化生成物の生成とその構造

F酸メチルエステル類は、自動酸化を受け易く、dioenoateを経て、不飽和F酸メチルに変化することが知られている（G. Rosenblat et al. J. Am. Oil Chem. Soc. 70（5）, 501-505（1993））。該F酸エチ

*orbax ODS（野村科学）に供し、F酸エチルエステル混合物を得た。分析に供する目的で、別途、F酸トリグリセリドを常法によりメチルエステル化し、太田らの方法に従って、F酸の同定を行った。その結果、該エチルエステルのフラン酸組成（モル%）は、化1及び表6のフラノイド脂肪酸の構造に従って、F6が59%、F4 20%、F5 13%、F2 6%及びF8 2%であった。

【0040】

【化1】

※ルエステルを、Roseublatらの方法に従って、解析した結果、類似の自動酸化生成物が、約8%含まれていることが判明した。

20 【0043】2. 実験動物及び実験飼料

1) 実験動物とその飼育方法

実施例1と同様に実施した。

【0044】2) 実験飼料

F酸エチルエステル0.5%にラードを8.5%加えて、F酸エチル区とした以外は、実施例1に準じた。

【0045】3. 動物処理方法及び分析方法

実施例3と同様に行った。

【0046】4. 結果

UCPは、対照区を100として、その他に関しては、各測定値を表7に示した。飼料摂取量に差がなかったにもかかわらず、飼育後の体重は、F酸エチル区で、対照区に比べ、有意に低くなっていた。飼育期間中、各区とも軟便、下痢などの症状は見られず、便の量にも差は見られなかった。UCP発現量は、F酸エチル区が、対照区に対し、約3倍弱の増加を示した。また、体重当たりの腸管膜脂肪及び腹腔内脂肪（腸管膜脂肪、精巣周囲脂肪及び腎周囲脂肪の合計）の割合で、F酸エチル区は対照区に比較して、有意に少なく、これはF酸エチルエステルが、UCP発現量を著増させることによって腹腔内脂肪はもとより、腸管膜脂肪蓄積抑制及び腸管膜蓄積脂肪低減化を亢進させることを示している。

【0047】

【表7】

	ラード群 (対照区)	F酸エチル群
体重(g)	519.3 ± 29 b	461 ± 18.1 a*
飼料摂取量(g)	1051 ± 75	1043 ± 29
体重当り腸間膜脂肪(%)	1.01 ± 0.19 b	0.71 ± 0.13 a
体重当り腹腔内脂肪合計(%)	5.49 ± 1.05 b	3.71 ± 0.83 a
体重当り褐色脂肪(%)	0.081 ± 0.015	0.090 ± 0.019
UCP	100 ± 11 b	291 ± 25 a*

数値は、平均±標準偏差を表す。

腹腔内脂肪合計：腸間膜脂肪、精巣周囲脂肪、腎周囲脂肪量の合計

UCP：対照ラード区を100とした時の相対値で表示

共通の符号の付いていない文字間で有意差あり(p<0.05), *p<0.01

【0048】実施例5

1. 試料の調製

1) α-リノレン酸エチルエステルの共役異性化物の調製と分析

α-リノレン酸エチルエステル(シグマ社製)から実施例3と同様の方法によってその共役異性化物を調製した。UV吸収法及びHPLC分析によってほぼ完全に共役異性化されていることが確認された。

2) エイコサペンタエン酸(EPA)エチルエステルの共役異性化物の調製と分析 EPAエチルエステル(シグマ社製)から実施例3と同様の方法によってその共役異性化物を調製した。UV吸収法及びHPLC分析によってほぼ完全に共役異性化されていることが確認された。

【0049】2. 実験動物及び実験飼料

1) 実験動物とその飼育方法

実施例1と同様に実施した。

2) 実験飼料

共役化α-リノレン酸エチルエステル1.0%にラードを8%加えて、共役ALAエチル区とし、同様に、共役化EPAエチルエステル1.0%にラードを8%加えて、共役EPAエチル区とした以外は、実施例1に準じ*

*た。

【0050】3. 動物処理方法及び分析方法

実施例3と同様に行った。

【0051】4. 結果

UCPは対照であるラード区を100として、その他に関しては各測定値を表8に示した。飼料摂取量に各試験区間で差はなかったにもかかわらず、飼育後の体重は共役ALAエチル区、共役EPAエチル区ともに、対照区と比べ有意に低くなっていた。飼育期間中には各試験区とも軟便、下痢などの症状は見られず、便の量にも差異は見られなかった。UCP量は共役ALAエチル区で対照ラード区の約1.7倍、共役EPAエチル区で約2.4倍の増加を示した。また、体重当たりの腸間膜脂肪及び腸間膜脂肪、精巣周囲脂肪、腎周囲脂肪を合わせた腹腔内脂肪の総量において、両共役酸区はラード区と比較して有意に少なかった。これはα-リノレン酸エチルエステル及びEPAエチルエステルのそれぞれの共役異性化物が腸間膜脂肪を含む腹腔内脂肪の蓄積抑制機能を有していることを示している。

【0052】

【表8】

	ラード区	共役ALAエチル区	共役EPAエチル区
体重(g)	507.8±12.4 a	469.7±16.4 b	471.3±20.5 b
飼料摂取量(g)	994±54	1022±63	982±38
体重当り腸間膜脂肪(%)	0.98±0.09 a	0.65±0.18 b	0.68±0.10 b
体重当り腹腔内脂肪合計(%)	4.85±0.64 a	3.85±0.56 b	3.71±0.48 b
体重当り褐色脂肪(%)	0.088±0.012	0.093±0.021	0.079±0.011
UCP	100±11 a	169±19 b	240±27 c

数値は、平均±標準偏差を表す。

腹腔内脂肪合計：腸間膜脂肪、精巣周囲脂肪、腎周囲脂肪量の合計

UCP：対照ラード区を100とした時の相対値で表示

共通の符号の付いていない文字間で有意差あり(p<0.05)

【0053】

【発明の効果】本発明によって得られる上記物質は、ヒトを含む哺乳動物及び鳥類の生体組織における細胞の内、nSTの主要組織である骨格筋、WAT及びBAT等の、例えばBA、ミトコンドリア含有細胞及びWA等のMCの脱共役呼吸乃至MC内膜のプロトンリークを特異的に亢進する作用を有する。本発明により、該物質を有効成分として含む抗肥満（内臓脂肪（特に腸管膜脂肪）蓄積抑制）及び抗内臓（特に腸管膜）蓄積脂肪低減*

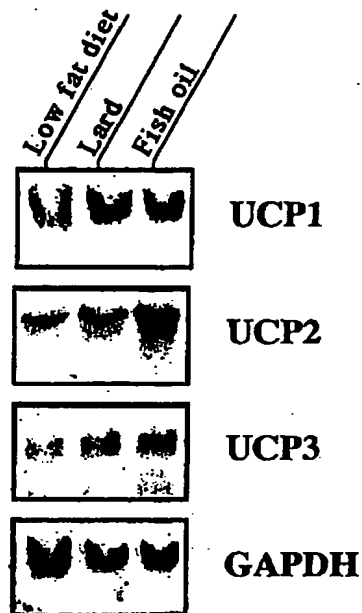
* 化剤、該物質を有効成分として含む抗肥満（内臓脂肪（特に腸管膜脂肪）蓄積抑制）及び内臓（特に腸管膜）脂肪低減化機能を付してなる食品、該物質を有効成分として含む抗肥満（内臓脂肪（特に腸管膜脂肪）蓄積抑制）及び内臓（特に腸管膜）蓄積脂肪低減化機能を付してなる飼料が提供される。

【図面の簡単な説明】

【図1】肩甲骨間BATに発現するUCP同族体のmRNAの濃度を示す。

10

【図1】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7

識別記号

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K 31/23
C 0 7 C 69/587
C 1 1 B 7/00

A 6 1 K 31/23
C 0 7 C 69/587
C 1 1 B 7/00

(72) 発明者 水野 雅之

東京都千代田区神田神保町2丁目46番地
吉野ビル1階 株式会社ジャニフ・テック
内